·综　述·

多重耐药鲍曼不动杆菌分子机制研究进展

张景皓,方　毅 综述,赵　虎△审校
(复旦大学附属华东医院检验科,上海 200040)

关键词:鲍曼不动杆菌;　抗药性,多药;　β-内酰胺类;　耐药基因
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.22.036　**文献标识码**:A　**文章编号**:1673-4130(2014)22-3085-03

鲍曼不动杆菌为革兰阴性非发酵菌,广泛分布于人体体表和与外界相通的部位,是呼吸道、胃肠道的正常菌群,也是引起医院内感染的重要病原菌。特别是在重症监护病房,其检出率和耐药率不断上升,给临床治疗带来了困难[1]。鲍曼不动杆菌耐药的机制非常复杂,目前的研究主要从分子水平上阐述其多重耐药的机制[2]。本文就其多重耐药分子机制进行综述。

1　产生灭活酶

1.1　产β-内酰胺酶

1.1.1　产超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)　ESBLs是由细菌质粒介导的一类β-内酰胺酶,能够水解第三代头孢类抗菌药物(如头孢他啶、头孢噻肟)及单环酰胺类抗菌药物(如氨曲南)。ESBLs大部分属Ambler A类酶,按传统的分类法,可分为TEM型、SHV型、非TEM型及非SHV型等(包括CTX-M、OXY、SIM、PER等)。SHV型ESBLs有28种,其中SHV-1最为常见,CTX-M包括CTX-M1-10、Toho-1和Toho-2,对头孢噻肟水解能力强,而对头孢他啶水解能力弱,因此体外药敏试验中产生此酶的菌株常对头孢噻肟耐药,而对头孢他啶较敏感[3]。鲍曼不动杆菌产生的ESBLs主要是PER-1型、VEB-1型和TEM型[4]。TEM型ESBLs有71种,其中TEM-1是革兰阴性菌中最为常见的β-内酰胺酶,TEM-1、TEM-2的广泛存在是不动杆菌属对β-内酰胺类抗菌药物耐药的主要机制。

1.1.2　金属β-内酰胺酶　鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制是产生碳青霉烯酶。金属β-内酰胺酶是B类β-内酰胺酶,能够水解碳青霉烯类抗菌药物以及除氨曲南以外的其他β-内酰胺类抗菌药物。B类酶与A类、D类酶的活性位点不同,因其活性位点为金属离子Zn^{2+},称为金属β-内酰胺酶(MBLs)。IMP型MBLs于1988年首次在日本的1株铜绿假单胞菌中被发现,目前已经在世界各地不同属的细菌中发现,在鲍曼不动杆菌中IMP型MBLs通常被作为Ⅰ类整合子的部分被检出,迄今被描述的有IMP-1、IMP-2、IMP-4、IMP-5、IMP-6、IMP-11[5]。目前鲍曼不动杆菌中已被鉴别出来的获得性MBLs有IMP型、VIM型和SIM-1型酶,整合子编码的VIM-1型酶于1997年首次在铜绿假单胞菌分离株中被发现,VIM-2型酶只在朝鲜有报道[6]。

1.1.3　碳青霉烯酶(OXA)　OXA又称苯唑西林酶,属Ambler分类中的D类酶,按同源性可分为2组:第1组的代表为OXA-23,第2组的代表为OXA-24[7]。OXA-23基因有的位于质粒,有的位于染色体,在世界各地传播的临床分离耐药株中,均有OXA基因的存在,除以上基因外,还有OXA-51、OXA-58等多达45种以上[8]。OXA的特点是具有重要的遗传多样性,β-内酰胺水解谱有明显的异质性,编码D类β-内酰胺酶的是已知的许多革兰阴性杆菌(包括鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌)的内在基因[9]。目前,国内分离的耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌(CRAB)中报道较多的是产生OXA-23、OXA-24、OXA-58[10-11]。廖晚珍等[12]发现CRAB的blaOXA-23基因上游存在插入序列ISAbal,该序列可能通过提供启动子、插入失活等方式参与耐药基因的表达,导致鲍曼不动杆菌的多重耐药性和泛耐药。

1.1.4　AmpC酶　AmpC酶由ampC基因编码,可分为染色体介导和质粒介导2种,ampC操纵子具有β-内酰胺酶表达的调节模型。ESBLs介导的AmpC酶基因自发突变在革兰阴性杆菌中较为常见,AmpC酶DHA-1、CMY-2等与β-内酰胺酶和(或)OmpK35缺失可能在碳青霉烯类获得性耐药中起着关键作用,这种缺失或突变可以发生在ampC操纵子上或其他结构基因,导致AmpC酶活性改变或表达量上调。与其他革兰阴性菌一样,鲍曼不动杆菌也具有染色体介导的C类β-内酰胺酶,系统进化分析法发现,不动杆菌属中的染色体ampC基因可能起源于一个共同的β-内酰胺酶基因的祖先,而且这种ampC基因在属内各菌种之间较其他种属的细菌更为密切,它代表了严格的β-内酰胺酶家族,即鲍曼不动杆菌衍生的头孢菌素酶[13]。AmpC酶在多重耐药或泛耐药的鲍曼不动杆菌中的阳性率在80%以上。由bla基因编码的C类头孢菌素酶能水解青霉素类、窄谱及广谱头孢菌素类抗菌药物,但不水解头孢吡肟或碳青霉烯类抗菌药物。bla基因中的blaADC是发现较早且已登录到GenBank、为不动杆菌所特有的染色体介导的头孢菌素酶。

1.2　鲍曼不动杆菌产生多种修饰酶(AMEs)

AMEs能催化修饰一个已插入多核苷酸链中的正常碱基,使其形成稀有碱基,编码的蛋白质与药物相互作用,影响药物与菌体靶位点的结合,这是氨基糖苷类耐药的重要原因。目前所研究的氨基糖苷类修饰酶包括氨基糖苷磷酸转移酶、氨基糖苷乙酰转移酶和氨基糖苷类核苷酸基转移酶类,已检出的有aphA1、aphA6、aacC1、aacC2、aacA4、aadA1和aadB[14]。在日本发现了1种新型的AME,它由aac(6′)-Iad编码,在鲍曼不动杆菌阿米卡星耐药机制中发挥着重要作用[15]。研究者从德黑兰的鲍曼不动杆菌分离株中检出最多的是aph(3′)-Via(检出率90.6%),铜绿假单胞菌中检出最多的是aph(3′)-IIb(检出率61.8%)[16]。有研究者检出了aac(3)-Ⅰ、aac(6′)-Ⅰb、ant(3″)-Ⅰ、aph(3′)-Ⅰ等4种氨基糖苷类修饰酶基因[17]。到目前为止,还未发现能够同时修饰多个氨基糖苷类药物的双功能修饰酶。

1.3　16S rRNA甲基化酶与鲍曼不动杆菌耐药

16S rRNA甲基化酶的编码基因rmtA为氨基糖苷类耐药基因,首先分离自铜绿假单胞菌。转化和转导rmtA基因的大肠杆菌表现出对各种氨基糖苷类药物(如异帕米星、妥布霉素、阿米卡星、卡

作者简介:张景皓,女,医学学士,主要从事临床微生物学研究。　△　通讯作者,E-mail:hubertzhao@163.com。

那霉素、庆大霉素、阿贝卡星等)具有很高的耐药性。长度为756 bp的 rmtA 基因编码蛋白质 RmtA,该蛋白与耐氨基糖苷类抗菌药物的放线菌产生的 16S rRNA 甲基化酶显示出很大的相似性,该蛋白可以通过甲基化作用保护细菌 16S rRNA 免受内源性氨基糖苷类抗菌药物的作用,使细菌核蛋白得到保护[18]。产 16S rRNA 甲基化酶的革兰阴性菌对所有临床上重要的氨基糖苷类抗菌药物高度耐药,研究者从 101 株鲍曼不动杆菌中检出了 70 株产 16S rRNA 甲基化酶的菌株,而其中 52 株同时携带有 blaoxa-51 和 blaoxa-23 样基因,且不同医院分离的菌株编码 16S rRNA 甲基化酶的基因不同,其中检出最多的是 armA 和 rmtB 基因[19]。armA 是迄今为止在世界范围存在最为普遍,与阿米卡星高水平耐药相关的基因,携带该基因的细菌往往对氟喹诺酮类抗菌药物也耐药。对 2 株多重耐药多位点序列分型分析所反映出的具有代表性的脉冲场凝胶电泳图谱表明,它们的分类序列类型为 ST2,该结果表明产 16S rRNA 甲基化酶的鲍曼不动杆菌最初对碳青霉烯类敏感,但以后通过多元化机制获得了对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性[20]。

1.4 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 革兰阴性杆菌喹诺酮类耐药主要与其作用靶位 DNA 回旋酶编码基因 gyrA 突变相关,喹诺酮类获得性耐药基因有喹诺酮作用靶位保护蛋白基因(如 qnrA、qnrB、qnrS),对喹诺酮也有修饰作用的氨基糖苷类修饰酶基因 aac(6′)-Ⅰb-cr,喹诺酮药物特异外排泵基因 qepA。在高度耐药的鲍曼不动杆菌中,gyrA 基因的喹诺酮耐药决定区发生基因突变,导致 1 个丝氨酸到亮氨酸的改变,类似在大肠埃希菌 Ser83 位置的改变,表明 DNA 旋转酶基因突变是鲍曼不动杆菌氟喹诺酮类药物耐药的主要反应[21]。gyrA 和 gyrB 基因参与编码 DNA 解旋酶的 A 和 B 亚基,parC 和 parE 基因负责编码拓扑异构酶 IV 的 C 和 E 亚基。由质粒介导的 3 个喹诺酮耐药基因 qnr、aac(6′)-Ⅰb-cr 和 qepA 通过不同的机制参与喹诺酮类和氟喹诺酮类药物的低水平耐药:qnr 蛋白对喹诺酮类药物的作用是保护酶蛋白,aac(6′)-Ⅰb-cr 蛋白是 1 种修饰喹诺酮类的乙酰转移酶,qepA 蛋白是一种主动外排泵[22]。

2 整合子介导鲍曼不动杆菌耐药

整合子是含 2 组基因的捕获和传播系统,整合子的第 1 部分包括 1 个编码特异性重组体的特定位点基因,而第 2 部分包括被称为基因盒的 DNA 片段,可分为 6 类。整合子的水平转移可解释耐药基因的扩散和多重耐药菌株的产生。以Ⅰ类整合子最为常见,其中最多见的是 aac 基因家族,其次是 aadA 基因和 TEM-1 基因。有研究者从多重耐药菌株中检出6.4%的Ⅰ类整合子基因盒,包括 AacC1-AAC(3)I-aadA1、AacC1-aadA1、AAC(3)-I、AAC(3)-I-AAC(3)-I-aadA1、TEM-1、AAC(3)-I-aadA1-AAC(3)-I-AAC(3)-I、AAC(3)-I-AAC(3)-I-AAC(3)-I-aadA1、AAC(3)-I-aadA1、AAC(3)-I-AAC(3)-I、AAC(3)-I-aadA1-AAC(3)-I-aadA1、AAC(3)-I-AAC(3)-I-aadA1-AAC(3)-I-aadA1[23]。Ⅰ类整合子阳性菌株除了对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率较低外,对其他多种抗菌药物普遍表现出较高的耐药率,呈现出严重的多重耐药现象[24]。Ⅱ类整合子在临床中较少见,常常协同Ⅰ类整合子出现,与细菌耐药性的关系还不清楚[17]。

3 外排泵介导鲍曼不动杆菌耐药性

外排泵在细菌耐药机制中体现了一种独特的现象:通过 1 个单一的机制导致对几个不同类抗菌药物耐药。外排泵特定家族已在不同种属的细菌中被广泛发现和鉴定,包括主要促进者超家族、小的多药耐药性的家族、多药耐药和有毒化合物排出超家族和耐药结节细胞分化超家族等[25]。鲍曼不动杆菌的 AdeABC 主动外排泵属于耐药结节细胞分化超家族成员。它可以将氨基糖苷类、头孢噻肟、四环素、红霉素、氯霉素、甲氧苄啶和氟喹诺酮类药物泵出。AdeABC 主动外排泵的表达也可以赋予细菌耐高水平的碳青霉烯类抗菌药物,1 个控制该泵表达的机制可以解释为两级调节器(adeR)和传感器(adeS)系统;在 adeR 或 adeS 基因,1 个单一位点突变可以使其过度表达而导致外排增加,有研究报道,从鲍曼不动杆菌中鉴定出了另外 1 个多药耐药外排泵 AbeM,已被确定为多药耐药和有毒化合物排出超家族的 1 个成员,其抗菌药物底物谱似乎仅限于氟喹诺酮类药物[26]。除此之外,还存在氯霉素抵抗基因编码外排氯霉素的 MFS 外排泵。外排泵基因中最多见的是 adeB、adeJ、abeM、mdfA、qacEΔ1-sul1、tehA 等 6 种基因[27]。此外多重耐药鲍曼不动杆菌中 blaNDM-1 基因的检出率也较高,表明存在 blaNDM-1 基因的克隆传播,主动外排系统和 NDM-1 在鲍曼不动杆菌多重耐药性的形成中起重要作用[28]。

4 外膜孔蛋白的丢失

目前有报道外膜孔蛋白(Omp)的丢失或外排泵蛋白的过度表达是鲍曼不动杆菌对亚胺培南、美罗培南等碳青霉烯类抗菌药物耐药的重要机制之一,Limansky 等[29]发现 29kuOmp 的缺失与亚胺培南耐药相关,命名为 CarO(carbapenem-resistant associated out membrane protein),进一步研究显示 CarO 结构为β折叠桶状,由 10 个跨膜片段组成,其 N 末端信号序列及 1 个转膜圆桶状拓扑结构,参与鲍曼不动杆菌接受碳青霉烯类抗菌药物的流入。耐药株和敏感株差异膜蛋白组学鉴定出 CarO、OmpA 和推测相对分子量为 41×10^3 外排泵膜蛋白,表明膜孔蛋白 CarO 表达缺失可能参与鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药[30]。

5 耐消毒剂-磺胺类耐药基因

amvA 基因在异源宿主大肠杆菌 KAM32 表达导致对几种消毒剂的敏感度降低,包括吖啶橙、吖啶黄、苯扎氯铵、脱氧胆酸、溴化乙啶、甲基紫精等。DHA2 的家族成员,如金黄色葡萄球菌 qacA,是目前已知的针对不同结构的 1 价和 2 价阳离子抗菌化合物,是消毒剂耐药基因,细菌获得 qac 基因并表达可将消毒剂排出体外[31]。Qac 基因中分布较广的是 qacEΔ1 基因,存在于 3′末端保守区,由整合子介导,而 qacE 较少见,在超过 70%的携带 qacEΔ1 基因的分离株中含有 intl1 基因,而全部对苯扎氯铵耐药的菌株中均检出 intl1 基因,表明其与消毒剂耐药密切相关[32-35]。

综上所述,目前鲍曼不动杆菌所致医院内感染与日俱增。由于临床上广谱抗菌药物过度应用,以及各种侵入性治疗手段的普遍应用,使得鲍曼不动杆菌耐药性增加,并在医院不同部门水平传播。多重耐药性的产生涉及多种复杂的耐药机制,如各种水解酶的产生,外膜孔蛋白的缺失,主动外排及整合子介导等。临床医护人员应采取必要措施,如加强手卫生,执行严格的消毒隔离制度等,以减少医院内感染及耐药菌的产生,同时加强耐药菌监测和耐药分子机制研究,为耐药菌防控提供依据。

参考文献

[1] Gogou V,Pournaras S,Giannouli M,et al. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages:a 10 year study

in Greece (2000-09)[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(12): 2767-2772.
[2] Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, et al. Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages[J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 41(1): 11-19.
[3] Zhao WH, Hu ZQ. Acinetobacter: a potential reservoir and dispenser for β-lactamases[J]. Crit Rev Microbiol, 2012, 38(1): 30-51.
[4] 吕军，侯玲俐，杨宏伟，等. 多重耐药鲍曼不动杆菌超广谱 β-内酰胺酶基因检测及分布研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2010，24(9): 932-934.
[5] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(9): 826-836.
[6] Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(11): 4485-4491.
[7] 汤荣睿，龚雅利，张晓兵. 碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌耐药性分析及金属 β-内酰胺酶检测[J]. 重庆医学，2011，40(21): 2094-2095.
[8] Migliavacca R, Espinal P, Principe L, et al. Characterization of resistance mechanisms and genetic relatedness of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolated from blood, Italy[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75(2): 180-186.
[9] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(1): 24-38.
[10] 孙立颖，黄磊，徐国宾. 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌耐药特征及分子流行病学研究[J]. 临床检验杂志，2012，30(7): 553-556.
[11] 李文青，吴伟元，卢月梅，等. 碳青霉烯不敏感鲍曼不动杆菌耐药性与碳青霉烯酶耐药基因检测[J]. 实用预防医学，2013，5(20): 549-552.
[12] 廖晚珍，杨璐，温桂兰，等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 6 种基因及 ISAbal 插入序列的研究[J]. 检验医学，2012，9(4): 749-753.
[13] 张丽梅，苏丹虹，徐韫健. 鲍曼不动杆菌 AmpC 酶和 AmpC 耐药基因检测分析[J]. 检验医学与临床，2012，9(21): 2683-2685.
[14] 华川，宋娟，李杨，等. 泛耐药鲍曼不动杆菌相关耐药基因检测及分析[J]. 武警医学院学报，2011，20(5): 343-346.
[15] 李乃健，徐韫健，孙慧冰，等. 多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性与 AmpC 耐药基因的研究[J]. 热带医学杂志，2010，10(6): 669-729.
[16] Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1132-1138.
[17] Cho YJ, Moon DC, Jin JS, et al. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in Acinetobacter spp. and spread of armA in Acinetobacter baumannii sequence group 1 in Korean hospitals[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 64(2): 185-190.
[18] Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, et al. Genetic basis of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(11): 3837-3843.
[19] 刘振茹，凌保东. 多重耐药鲍曼不动杆菌 16S rRNA 甲基化酶研究进展[J]. 中国抗生素杂志，2011，36(10): 727-732.
[20] 王卫华，陈洁，毛雄英，等. 泛耐药鲍曼不动杆菌获得性耐药基因，可移动遗传元件检测及指标聚类分析[J]. 浙江检验医学，2012，10(2): 10-14.
[21] Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, et al. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae pediatric clinical isolates in Mexico[J]. PLoS One, 2013, 8(10): 77968.
[22] 胡芳，付英梅，马佳毓. 整合子与细菌耐药性[J]. 微生物学杂志，2006，26(2): 79-81.
[23] 李先平，王敏，王姝姝，等. 整合子介导鲍曼不动杆菌耐药机制的研究[J]. 中国病原生物学杂志，2012，7(10): 735-738.
[24] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(4): 593-656.
[25] Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12): 3375-3380.
[26] Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Novel role of Acinetobacter baumannii RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(2): 228-232.
[27] Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in Acinetobacter baumannii[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(2): 557-562.
[28] Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, et al. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in Acinetobacter baumannii[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(10): 4389-4393.
[29] 李永丽，应春妹. 鲍曼不动杆菌主动外排系统和 NDM-1 基因分布特征及与耐药表型的关系[J]. 上海交通大学学报：医学版，2012，32(7): 866-870.
[30] Nigro SJ, Hall RM. Tn6167, an antibiotic resistance island in an Australian carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii GC2, ST92 isolate[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(6): 1342-1346.
[31] Fernández CF, Sánchez MC, Caballero-Moyano FJ, et al. Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii[J]. Intern J Antimicrob Agents, 2012, 39(6): 472-477.
[32] Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in Acinetobacter baumannii is associated with imipenem resistance[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(12): 4776-4778.
[33] 佘婷婷，沈继录，徐元宏，等. 广泛耐药鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类抗生素膜蛋白机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志，2012，12(4): 280-282.
[34] Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in Acinetobacter baumannii[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(9): 1919-1925.
[35] Chuanchuen R, Khemtong S, Padungtod P. Occurrence of qacE/qacEDelta1 genes and their correlation with class 1 integrons in salmonella enterica isolates from poultry and swine[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2007, 38(5): 855-862.

(收稿日期：2014-04-14)